

Aus dem Institut für Humangenetik und Anthropologie
der Universität Erlangen - Nürnberg
Direktor: Professor Dr. R. A. Pfeiffer

Chromosomenuntersuchungen an Lymphozyten von Patienten unter zytostatischer Intervalltherapie

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen - Nürnberg

vorgelegt von
Josefine Lösing
aus Vreden/Westfalen

Aus dem Institut für Humangenetik und Anthropologie
der Universität Erlangen - Nürnberg
Direktor: Professor Dr. R. A. Pfeiffer

Chromosomenuntersuchungen an Lymphozyten von Patienten unter zytostatischer Intervalltherapie

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen - Nürnberg

vorgelegt von
Josefine Lösing
aus Vreden/Westfalen

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan: Prof. Dr. W. Kersten

Referent: Prof. Dr. E. Gebhart

Korreferent: Prof. Dr. R.A. Pfeiffer

Tag der mündlichen Prüfung: 06.04.1981

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	4
Patientenauswahl und Methodik	6
Ergebnisse	8
Diskussion	12
Zusammenfassung	17
Literatur	18
Tabellen und Abbildungen	24

Einleitung

Eine Methode, mutagene Substanzen zu erfassen, ist die Untersuchung ihrer chromosomenschädigenden Wirkung in Lymphozytenkulturen aus dem venösen Blut chemisch belasteter Probanden. Zu den Vorteilen dieser Methode zählen die einfache Gewinnung des Untersuchungsmaterials, die im Verhältnis wenig aufwendige Labortechnik und die Einbeziehung des menschlichen Stoffwechsels als wichtiges Beurteilungskriterium. Ein wesentlicher Nachteil ist das Einwirken der Substanz während der G₀-Phase der Lymphozyten. Clastogene Agentien induzieren Aberrationen häufig in der S-Phase (Kihlman 1966; Rieger, Michaelis 1967) und werden, wenn sie außerdem schwach wirksam sind, mit dieser Methode nicht erfaßt.

Besonders die chromosomenschädigende Wirksamkeit oft hochmutagener Zytostatika läßt sich in Lymphozyten chemotherapeutisch behandelter Patienten häufig sehr gut nachweisen. Trotz zahlreicher gesicherter, im Verlauf der letzten 18 Jahre erarbeiteter Untersuchungsergebnisse für verschiedene Chemotherapeutika (Gebhart 1973, 1980 in Vorbereitung), wurde die Empfindlichkeit der Methode wegen einzelner widersprüchlicher Ergebnisse und vor allem aufgrund einer Arbeit von Schinzel und Schmid (1976) in Frage gestellt. In dieser Untersuchung fanden die Autoren bei 67 Patienten mit unterschiedlichen klinischen Diagnosen und entsprechenden zytostatischen Therapien selbst für bekannt starke Mutagene nur vereinzelt aussagekräftige Erhöhungen von Aberrationsraten.

Werden die Lymphozyten länger als zwei Tage in Kultur gehalten, so könnten aus ihnen ermittelte Aberrationsraten von den tatsächlich induzierten entscheidend abweichen. Durch Mutagene spezifisch hervorgerufene Chromosomenschäden werden zum größten Teil in der ersten Metaphase nach Einwirken des Agens sichtbar. Durch Repair- und Selektions-

mechanismen (von Aberrationen betroffene Zellen verlieren ihre Teilungsfähigkeit z.B. bei asymmetrischen Translokationen oder bei Verlust von Bruchstücken) können die in der ersten Metaphase sichtbaren Aberrationen in den folgenden Mitosen möglicherweise nicht nachgewiesen werden. Untersuchungen über die Verteilung erster, zweiter und dritter Mitosen in BrdU-markierten Lymphozyten zeigten, daß in 72-Stunden-Kulturen bis zu 75% zweite und dritte Mitosen zu finden sind (Beek, Obe 1979; Gebhart, persönl. Mitteilung). Aus diesem Grund wurde in letzter Zeit von vielen Autoren (Bauchinger, Schmid 1969; Nielsen et al. 1969; Kilian, Picciano 1976; Obe, Natarajan 1980) die 48-Stunden-Kultur bevorzugt, in der Überwiegend erste Metaphasen nach der Agenseinwirkung zur Analyse herangezogen werden können, in denen aber eine geringere Mitoseausbeute die Auswertbarkeit gelegentlich stark einschränkt.

In der vorliegenden Studie sollte nun eine eingehende Analyse des Aberrationsspektrums in 48-Stunden-Kulturen von Patienten, die einer zytostatischen Intervalltherapie nach einheitlichem Schema unterzogen wurden, weitere Erkenntnisse hinsichtlich der Anwendbarkeit und Zuverlässigkeit dieser Methode liefern, andererseits einen eingehenden Vergleich der erhaltenen Ergebnisse mit den Resultaten aus 72-Stunden-Kulturen der gleichen Patienten ermöglichen (Gebhart, persönl. Mitteilung). Zugleich war es von Interesse, ob und in welchem Maße die zytogenetischen Untersuchungen Hinweise auf unmittelbare Auswirkungen der einzelnen Therapieschübe, auf interindividuelle Sensibilitätsunterschiede und auf Langzeiteffekte einer zytostatischen Therapie geben können.

Patientenauswahl und Methodik

An der chirurgischen Universitätsklinik Erlangen wird seit einigen Jahren eine größere Anzahl von Patienten mit Rektum- und anderen Colocarzinomen postoperativ einer Zytostase ohne Radiatio unterzogen.

Angewendet wird eine Kombination von:

1. Methyl-CCNU, das als Nitrosoharnstoffderivat zu den alkylierenden Substanzen gehört.
2. 5-Fluoruracil, das metabolisch zu 5-Fluordesoxyuridin umgewandelt wird und so als Nukleinsäureantimetabolit wirkt.
3. Vincristin, das über eine Spindelzerstörung den Ablauf der Mitose hemmt.

Behandlungsschema:

I. Zytostasezyklus

1. Therapieschub: 1.Tag Methyl-CCNU (oral 150 mg/m^2 Körperoberfl.)
Fluoruracil (i.v. 300 mg/m^2 Körperoberfl.)
Vincristin (i.v. 1 mg/m^2 Körperoberfl.)

2.Tag }
3.Tag } Fluoruracil
4.Tag }
5.Tag }

1. Therapiepause: 28 Tage ohne Zytostatikagabe

2. Therapieschub: 1.Tag Fluoruracil
Vincristin

2.Tag }
3.Tag } Fluoruracil
4.Tag }
5.Tag }

2. Therapiepause: 28 Tage

II. Zytostasezyklus

Die Behandlung wird nach oben beschriebenem Schema laufend fortgesetzt.

Für eine größere cytogenetische Studie, in deren Rahmen die vorliegende Untersuchung durchgeführt wurde, ist bei diesen Patienten nach Mög-

lichkeit unmittelbar vor und nach den Therapieschüben venöses Blut entnommen worden. Die Tabelle 1 gibt Aufschluß über Alter und Geschlecht aller zunächst für die Untersuchung vorgesehenen Patienten und über die Verteilung der versuchten und erfolgreichen Chromosomenuntersuchungen auf die Therapieschritte.

Von jeder Blutprobe wurden für die Kulturdauer von 48 Stunden je 4 Lymphozytenkulturen und für 72 Stunden jeweils 2 Kulturen angelegt. Zum Kulturansatz wurden 15 Tropfen Vollblut, 0,5 ml fetales Kälberserum, 4,5 ml Penicillin-haltiges Kulturmedium F 10 und 1 Tropfen Phytohämagglutinin (Wellcome) verwendet. Die Präparate wurden mit der üblichen Lufttrocknungsmethode und mit Orcein-Färbung hergestellt.

Bei der mikroskopischen Auswertung waren der Blutentnahmezeitpunkt und die Patientendaten unbekannt. In jeweils 100 Metaphasen wurden folgende Chromosomenaberrationen registriert:

1. G' Chromatid-Gaps: nicht angefärbte Lücken in einem Chromatid
G'' Isochromatid-Gaps: nicht angefärbte Lücken auf beiden Chromatiden in identischen Abschnitten
2. B' Chromatidbrüche
B'' Isochromatidbrüche, bei denen ein Bruchereignis zugrundeliegt.
GB' Isochromatid-Gap-Bruch Aberrationen: Neben einem Chromatidbruch findet sich im Schwesterchromatid ein Gap auf gleicher Höhe.

Im mikroskopischen Bild unterscheiden sich Brüche von Gaps durch gegeneinander verschobene Bruchstückenden.

3. E' Chromatidaustausche als Translokationskreuze
E'' Chromosomenaustausche:
Dizentrische Chromosomen und azentrische Fragmente;
Atypische Translokationschromosomen
Ringchromosomen

Als auswertbar galten vollständige, 46 zählbare Chromosomen enthaltende Metaphasen.

Ergebnisse

In Tabelle 2 sind die Ergebnisse der erfolgreichen Chromosomenanalysen der einzelnen Zytostasezyklen und, da für die letzten drei Zyklen nur acht Werte vorliegen, die Ergebnisse des IV., V. und VI. Zyklus zusammengefaßt wiedergegeben. Die Häufigkeit der Chromosomenaberrationen, dargestellt durch die Mittelwerte der Bruchraten, der aberranten Metaphasen in Prozent und der Metaphasen mit Brüchen in Prozent nimmt sowohl gegenüber dem Kontrollwert vor Therapiebeginn als auch mit steigender Behandlungsdauer zu. Die Standardabweichungen als Maß für die Streuung sind sehr groß. Das gilt für die ersten drei Zytostasezyklen, die mit 5,15 und 11 Chromosomenuntersuchungen am besten repräsentiert sind und ebenso für die letzten drei Zyklen mit nur 2,4 und 2 Blutentnahmen. Bei der Besprechung der Einzelwerte wird das Problem ihrer großen Abweichung voneinander diskutiert.

Abbildung 1 verdeutlicht den Anstieg der Bruchraten. Die jeweiligen Zunahmen der Werte um mindestens das Dreifache des Mittelwertes der Kontrollen werden als hinreichend für den Nachweis einer Chromatid-aberrationen-auslösenden Wirkung der verwendeten Arzneimittel angesehen.

Die Verläufe der drei Wertereihen Bruchraten, aberrante Metaphasen und Metaphasen mit Brüchen zeigten eine gute Übereinstimmung, wie aus den Abbildungen 1 und 2 hervorgeht. Demnach nehmen Gaps unter steigender mutagener Belastung ebenso zu wie Bruchereignisse.

Die untersuchten 19 Patienten (9 m, 10 f) waren bei Therapiebeginn 24 bis 68 Jahre alt. Eine Zusammenstellung der Bruchraten nach Geschlecht und Altersgruppen findet sich in Tabelle 3. Der raschere Anstieg der Werte von männlichen gegenüber denen weiblicher Probanden im II. Zytostasezyklus könnte individuell bedingt sein, da die ausschlaggebenden Werte in der Altersgruppe 30 bis 40 Jahre von nur einem

Patienten (S.C.I. m) stammen. Es finden sich allerdings drei weitere Wertepaare von männlichen und weiblichen Patienten zu vergleichbaren Blutentnahmezeitpunkten, bei denen die Bruchraten der männlichen Probanden stets höher sind. Die geringe Anzahl von Wertepaaren erlaubt keine Aussage über eine unterschiedliche Empfindlichkeit der Geschlechter oder Altersgruppen gegen die untersuchten mutagenen Substanzen oder über in spezifischer Weise abweichende Spontanbruchraten.

In Tabelle 4 werden die Einzelergebnisse unter anderem nach Aberrationstyp aufgeführt. Chromatidbrüche sind bei weitem die häufigsten Bruchaberrationen. Als Chromosomenaustausche liegen 8 dizentrische Chromosomen mit azentrischen Fragmenten vor. Demgegenüber wurden 124 Chromatidtranslokationen gefunden. Die beobachteten Chromosomenschäden sind zum größten Teil Aberrationen vom Chromatidtyp.

Die einzelnen Bruchraten in Beziehung zum Therapieverlauf sind in Abbildung 3 dargestellt. Die 50 Untersuchungsergebnisse setzen sich zusammen aus 9 Kontrollen, 33 ausreichend auf die ersten 6 Therapieschübe verteilten Werte und nur 8 Auswertungen in den letzten 3 Zytostasezyklen.

30 von 41 Bruchraten unter zytostatischer Belastung sind höher als das Zweifache der größten Kontrollbruchrate.

Abbildung 4 zeigt, daß 3 Werte, die noch nach der zweiten MeCCNU-Gabe im unteren Kontrollbereich bleiben, der Patientin K.Ö.R. zugeordnet sind. Die Untersuchungen dieser Probandin ergaben vor dem vierten Therapieschub 68% und vor dem fünften Therapieschub 81% Teilungsfiguren mit 47 Chromosomen. Die durchgeführte Karyogrammanalyse ergab in diesen Zellen eine Triplo X-Konstitution (Gebhart, persönl. Mitteilung). Welche Bedeutung diesen auffälligen Beobachtungen zukommt, die auch hinsichtlich der Schwesterchromatidaustauschrate gemacht wurden (Gebhart, persönl. Mitteilung), bleibt offen.

Während des III. Zytostasezyklus ist die größte Zunahme der Bruchraten unmittelbar nach der Gabe von MeCCNU, Fluoruracil und Vincristin zu beobachten. Nach vier Wochen sinken die Werte, steigen nach dem 6. Therapieschub (Fluoruracil, Vincristin) an, um in den 28 Tagen ohne zytostatische Belastung vor dem 7. Schub auf ein gegenüber der mittleren Bruchrate vor dem 6. Therapieschub leicht erhöhtes Niveau zu fallen. Dieser guten Übereinstimmung des Aberrationsratenverlaufes mit dem Zytostaseschema darf keine zu große Bedeutung beigemessen werden, da für jeden Blutentnahmezeitpunkt des III. Zytostasezyklus nur 2 bis 4 Werte vorliegen. Außerdem ist im ähnlich stark repräsentierten II. Zytostasezyklus keine so weitgehende Parallelität zu den einzelnen Therapieschritten feststellbar.

Wertepaare einzelner Patienten sind den Tabellen 4 und 5 und der Abbildung 4 zu entnehmen. Die in Tabelle 5 zusammengefaßten Werte nach MeCCNU-, Fluoruracil- und Vincristin-Gabe sind deutlich höher als unmittelbar vor dem Therapieschub. Für die Abnahmen der Aberrationsraten bei den Patienten Z.A.N. (10. Therapieschub) und S.C.U. (12. Therapieschub) nach Fluoruracil- und Vincristin-Gabe ist kein Vergleich möglich, da in diesem Zeitraum keine anderen Wertepaare zur Verfügung stehen. Deshalb erscheint es zulässig, die Werte bis nach dem 6. Therapieschub zusammenzufassen. Dabei zeigen sich ähnliche Steigerungsraten vor und nach der Zytostatikagabe wie bei zusätzlicher MeCCNU-Gabe. Die Ergebnisse vor und nach den Therapiepausen lassen keine Überwiegenden Abnahmen erkennen. Die Steigerungsraten der Mittelwerte sind allerdings sehr viel geringer als nach den Therapieschüben.

Der Verlauf der Bruchraten einzelner Patienten in Abbildung 4 zeigt nicht nur eine hohe individuelle Variabilität, sondern auch ausgeprägte intraindividuelle Unterschiede in den verschiedenen Therapieschritten. Auffallend ist der stark abweichende maximale Einzelwert: L.A.N.; Blutentnahme nach dem 7. Therapieschub; $\frac{B}{M} = 1,02$. Bei dieser Auswertung

wurden mehrere Teilungsfiguren mit 5 bis zu 10 Bruchereignissen pro Metaphase gefunden. In allen übrigen Untersuchungen gab es nur vereinzelte Metaphasen mit höchstens 4 Brüchen.

In Tabelle 4 sind zusätzlich die Mitose-Indices (Anzahl Metaphasen von 1 000 Kernen) aufgeführt. Diese Werte geben einen groben Anhalt dafür, daß mit zunehmender Therapiedauer die Anzahl der Mitosen geringer wird. Die Zusammenfassung der Werte ergibt 20,5 ‰ vor Therapie,

18,42 ‰ nach dem ersten bis vor dem dritten,

26,2 ‰ nach dem dritten bis vor dem fünften,

10,5 ‰ nach dem fünften bis vor dem siebten und

12,8 ‰ nach dem siebten bis nach dem zwölften Therapieschub.

Tabelle 1 gibt einen weiteren Hinweis auf die im Laufe der Therapie zunehmende Proliferationshemmung. Bis vor dem sechsten Therapieschub konnten von 76 Präparatereihen 35 und nach dem 6. Schub von 54 nur 15 erfolgreich untersucht werden.

Diskussion

Die in der vorliegenden Studie geprüften Zytostatika sind bekannte und im Falle des Fluoruracil und Vincristin in zahlreichen Testsystemen untersuchte Mutagene. Wenn auch Literaturangaben über Mutagenitätstests mit MeCCNU unbekannt sind, so liegen für die verwandten Nitrosoharnstoffe BCNU und CCNU entsprechende Ergebnisse vor. Tate et al. (1976, 1977) untersuchten BCNU und CNU-Äthanol in verschiedenen Testsystemen an der Maus. Sie fanden vor allem im Mikronukleus-Test und in Chromosomenuntersuchungen an Knochenmarkszellen signifikante Effekte. Lambert et al. (1978) wiesen für sechs von sieben mit CCNU behandelte Patienten, drei davon in Monotherapie, gesteigerte SCE-Raten nach. Patienten, die mit BCNU in Kombination mit anderen Zytostatika behandelt worden waren, zeigten über Monate hinweg erhöhte Aberrationsraten, wobei es sich zum größten Teil um Chromatidtyp-Aberrationen handelte. (Harrod, Cortner 1968). In einer Untersuchung von Schinzel und Schmid (1976) wiesen neun von elf mit CCNU oder BCNU und anderen Zytostatika belasteten Patienten deutlich gesteigerte Raten sowohl von Chromosomen- als auch von Chromatidtyp-Aberrationen auf.

Durch Fluoruracil induzierte Chromosomenaberrationen, Übereinstimmend vor allem vom Chromatidtyp, wurden auch in pflanzlichen Testsystemen (Taylor, Haut u. Tung 1962; Bell u. Wolff 1964; Kihlman 1966) und in vitro an menschlichen Lymphozytenkulturen (Hampel et al. 1968; Fränz 1970) beobachtet. Lambert et al. (1978) und Musilova et al. (1979) konnten keine Erhöhung der SCE-Rate bei Fluoruracil-belasteten Patienten nachweisen.

Positive Ergebnisse für Vincristin fanden sich in Mikronukleustests in vivo an Säugerzellen (Heddle et al. 1977; Maier, Schmid 1976; Müller et al. 1978), im host-mediated assay als Test auf Punktmutationen und bei Chromosomenuntersuchungen in Spermatozyten der Maus (Müller et al. 1978). In vitro Untersuchungen an menschlichen Lympho-

zytenkulturen ergaben nur wenige mutagenetische Effekte (Kucerova, Polivkova 1977), keine erhöhten SCE-Raten (Morgan, Crossen 1980; Kucerova, Polivkova 1977) und ausgeprägte stathmokinetische Effekte (Gebhart, Schwanitz, Hartwich 1969). In dieser Arbeit wurden zudem leicht erhöhte Aberrationsraten und vor allem unspezifische Defekte bei Vinristin-belasteten Patienten beobachtet. Die in der vorliegenden Arbeit gefundenen Aberrationsraten dürften demnach eher auf die Wirksamkeit des MeCCNU und des Fluoruracil zurückzuführen sein.

Die Alters- und Geschlechtsverteilung der untersuchten Patienten entspricht der Häufigkeitsverteilung von Colocarzinom-Patienten. In der Kontrollgruppe weicht dieses Muster von der Gruppe der Untersuchten unter Belastung ab (2 m, 7 f / 4 von 9 Patienten sind 52 bis 60 Jahre alt). Trotzdem scheinen die Kontrollen gut geeignet, da sie nicht nur aus dem gleichen Krankengut wie die belasteten Patienten stammen, sondern in 5 von 9 Fällen Wertepaare einzelner Patienten vor und während der Therapie vorliegen.

Zur Frage der signifikanten Erhöhung der Aberrationsraten gegenüber einer Kontrollgruppe kann die Anzahl der untersuchten Patienten, der Einzeluntersuchungen und der jeweils ausgewerteten Metaphasen anhand der Erwägungen von Whorton et al. (1979) grob abschätzend als ausreichend angesehen werden. Sowohl die Einzelergebnisse als auch die nach Zytostasezyklen zusammengefaßten Werte zeigen beachtliche Aberrationssteigerungsraten gegenüber den Kontrollen. Demnach wird belegt, daß nach Behandlung mit Aberrationen-induzierenden Arzneimitteln charakteristischerweise an Lymphozytenkulturen Chromosomenschäden nachweisbar sind. Die großen intra- und interindividuellen Unterschiede in den Ergebnissen erschweren die Beurteilung, verdeutlichen jedoch, daß bei einer genügend großen Anzahl Probanden und Einzeluntersuchungen eindeutige Aussagen möglich sind.

Die untersuchten Patienten wurden bei gleicher klinischer Diagnose

alle demselben, nach Dosis und Zeitabständen streng definierten Behandlungsschema unterzogen. Da außerdem die Blutproben unmittelbar vor und nach den Therapieschüben entnommen wurden, sind genaue Aussagen über Abhängigkeit der Aberrationsraten vom Therapieverlauf möglich. Die eindeutige Zunahme der Chromosomenschäden mit den Zytostasezyklen erlaubt, die gefundenen Aberrationen direkt auf die Einwirkung der mutagenen Substanzen zurückzuführen und läßt die verwendete Methode als empfindlich und zuverlässig erscheinen.

Die Aberrationsanalyse in 48-Stunden-Kulturen als Teilaspekt einer größeren Studie kann auf einige Detailfragen wegen zu weniger Untersuchungsergebnisse keine eindeutigen Antworten geben. So läßt sich eine stärkere chromosomenschädigende Wirkung von MeCCNU gegenüber Fluoruracil weder gesichert zeigen noch widerlegen. In der Gesamtstudie mit 172 Einzeluntersuchungen aus 72-Stunden-Kulturen konnte dagegen der ausgeprägtere Einfluß von MeCCNU gegenüber den anderen Arzneimitteln verdeutlicht werden (Gebhart, mündliche Mitteilung).

Für die Beurteilung der annähernd gleichbleibenden Aberrationsraten vier Wochen nach einem Therapieschub gilt wieder die Einschränkung, daß zu wenig Wertepaare vorliegen. Überwiegende, wenn auch leichte Abnahmen ergeben sich aus den Werten der Gesamtstudie. (Gebhart, mündliche Mitteilung). Offensichtlich läßt sich jedoch ein großer Teil der induzierten Aberrationen noch 4 Wochen nach Therapieende nachweisen. Harrod und Cortner (1968) konnten für BCNU-behandelte Patienten 1 bis 11,5 Monate nach Therapieende noch Aberrationserhöhungen aufzeigen. Brøgger (1979) berichtet zu der Frage, wie lange nach In-vivo-Belastung Chromosomenschäden in Lymphozyten nachweisbar sind, über stark voneinander abweichende Befunde in der Literatur, und er vermutet, daß entsprechend den unterschiedlichen Wirkungsweisen der chemischen Substanzen die Schäden verschieden lange persistieren. In nicht proliferierenden Zellen könnten Moleküle von Mutagenen im Chro-

matin gespeichert werden und erst nach langer Zeit in Wechselwirkung mit Prozessen der DNS-Synthese oder -Reparatur treten.

Da die Anzahl der Gaps im Therapieverlauf nahezu parallel zu den Bruchraten steigt, liegt der Schluß nahe, daß auch eine erhöhte Achromasierate die Einwirkung einer mutagenen Substanz anzeigen kann.

Die im Gegensatz zu den 72-Stunden-Kulturen höhere Anzahl an nicht erfolgreichen Untersuchungen und die niedrigeren Mitoseindices (Gebhart, mündliche Mitteilung) belegen die schlechtere Ausbeute an auswertbaren Metaphasen in 48-Stunden-Kulturen. Einige Autoren verlangen möglichst kurze Kulturzeiten; unter anderen empfehlen Evans und O'Riordan (1975) eine Höchstdauer von 50 Stunden. Crossen und Morgan (1978) halten die 42-Stunden-Kultur für die geeignetste, da sie anhand von BrdU-markierten Lymphozyten in Einzelfällen bereits in den 48-Stunden-Kulturen bis zur Hälfte aller Mitosen in zweiter Teilung vorfanden. Dem stehen Beobachtungen in parallelen Auswertungen von 48- und meist 72-Stunden-Kulturen gegenüber, in denen allenfalls kleine Unterschiede in Anzahl und Typenverteilung der Aberrationen gefunden wurden (Bauchinger, Schmid 1969; Nielsen et al. 1969; Kilian, Picciano 1976). Die im Zusammenhang der Gesamt-Studie zu den 48-Stunden-Kulturen parallel ausgewerteten Präparate aus 72-Stunden-Kulturen wiesen leicht, aber nicht signifikant niedrigere Bruchraten auf. Jedoch verschiebt sich hier das Verhältnis von Chromatid- zu Isochromatidbrüchen zugunsten der letzteren. Zudem lassen sich in den 72-Stunden-Kulturen mehr Chromosomen- als Chromatidaustausche finden (Gebhart, persönl. Mitteilung). Diese Ergebnisse könnten einerseits dahingehend interpretiert werden, daß schwer geschädigte Zellen langsamer proliferieren und so als erste Mitosen mit verhältnismäßig hohen Aberrationsraten in den länger als zwei Tage dauernden Kulturen zu sehen sind, andererseits gehen aber sicher auch reduplizierte Chromatid-Aberrationen aus Lymphozyten, die in Kultur die zweite Teilung erreicht haben, in die Analyse ein.

Aufgrund der genannten Tatsachen erscheinen bei sorgfältiger Durchführung Chromosomenuntersuchungen an in vivo belasteten Probanden nicht nur als zuverlässig, sondern auch in hohem Maße geeignet, das Einwirken von mutagenen Substanzen nachzuweisen. Wird eine genügend große Anzahl Probanden einer möglichst homogenen Gruppe unter gleichartiger Belastung nach Möglichkeit langfristig untersucht, ergeben sich eindeutige Resultate. Dabei spielt der Blutentnahmezeitpunkt nach Belastung sicherlich eine wesentliche Rolle. Ob angesichts des größeren Aufwands eine Untersuchung an höchstens 48-Stunden alten Kulturen vorgenommen werden sollte, kann aufgrund der vorliegenden Arbeit nicht endgültig beurteilt werden und muß sicher auf der Basis der Wirksamkeit der untersuchten Substanzen in jedem Einzelfall entschieden werden.

Zusammenfassung

Vor und während einer zytostatischen Intervall-Therapie mit Methyl-CCNU, Fluoruracil und Vincristin wurden von 19 Patienten 50 Chromosomenanalysen aus Lymphozytenkulturen von 48 Stunden Dauer erstellt. Gegenüber den Kontrolluntersuchungen fanden sich im Verlauf der Therapie in eindeutig gesteigerter Häufigkeit Chromosomenaberrationen, vor allem vom Chromatidtyp. Da zudem die sichtbaren Chromosomenschäden mit fortschreitender Behandlungsdauer und nach den Therapieschüben zunahmen, konnten die gefundenen Aberrationssteigerungen dem clastogenen Einfluß der verwendeten Arzneimittel zugeschrieben werden. Das Ausmaß an Chromosomenaberrationen zeigte eine starke Variabilität, sowohl in bezug auf die individuellen Ergebnisse im Verlauf der Behandlung, als auch bei verschiedenen Patienten zu einem Zeitpunkt der Therapie. Die Chromosomenschäden waren zu einem großen Teil noch vier Wochen nach Beendigung eines Therapieschubs nachweisbar. Aufgrund der gefundenen Ergebnisse wurde die verwendete Methode als genügend zuverlässig und empfindlich angesehen, um Chromosomenschäden an Patienten nachzuweisen, die mit chemischen Mutagenen belastet wurden.

Literatur:

BAUCHINGER M.; SCHMID E.

Cytogenetische Veränderungen in weißen Blutzellen nach Cyclophosphamidtherapie.

Z. Krebsforschung 72 (1969) 77 - 87

BEEK B.; OBE G.

Sister chromatid exchanges in human leukocyte chromosomes: spontaneous and induced frequencies in early- and late-proliferating cells in vitro.

Human Genetics 49 (1979) 51-61

BELL S.; WOLFF S.

Studies on the mechanism of the effect of Fluorodeoxyuridine on chromosomes.

Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 51 (1964) 195-202

BRØGGER A.

Chromosome damage in human mitotic cells after in vivo and in vitro exposure to mutagens. In: K. Berg (ed.); Genetic damage in man caused by environmental agents.

Academic Press; New York, San Francisco, London (1979)

CROSSEN P.E.; MORGAN W.F.

Occurrence of first division metaphases in human lymphocyte cultures.

Hum. Genet. 41 (1978) 97-100

DEGRAEVE N.

Genetic and related effects of Vinca rosea alkaloids.

Mut. Res. 55 (1978) 31-42

EVANS H.J.; O'RIORDAN M.L.

Human peripheral blood lymphocytes for the analysis of chromosome aberrations in mutagen tests.

Mut. Res. 31 (1975) 135-148

FRÄNZ J.

Chromosome aberration induced by antimetabolites.

In: F. Vogel; G. Röhrborn (Eds.): Chemical mutagenesis in mammals and man.

Springer; Berlin, Heidelberg, New York (1970)

GEBHART E.; SCHWANITZ G.; HARTWICH G.

Zytogenetische Wirkung von Vincristin auf menschliche Leukocyten in vivo und in vitro.

Med. Klin. 51 (1969) 2366-2371

GEBHART E.

The treatment of human chromosomes in vitro: results.

In: F. Vogel; G. Röhrborn (Eds.): Chemical mutagenesis in mammals and man.

Springer; Berlin, Heidelberg, New York (1970)

GEBHART E.

Chromosomenaberrationen bei chemisch belasteten Personen.

Ärztl. Praxis 25 (1973) 665-666

GEBHART E.

Chemische Mutagenese

Gustav Fischer Verlag Stuttgart New York (1977)

GEBHART E.

The epidemiological approach: chromosome aberrations in persons exposed to chemical mutagens.

In Vorbereitung. 1980

HAMPEL K.E.

Über die Wirkung von Zytostatika auf die Chromosomen des Menschen.

Int. Z. für Klinische Pharmakologie, Therapie und Toxikologie

4 (1968) 322-371

HARROD E.K.; CORTNER J.A.

Prolonged survival of lymphocytes with chromosomal defects in children treated with BCNU.

J. Nat. Cancer Inst. 40 (1968) 269-279

HEDDLE J.; BRUCE W.

On the use of multiple assays for mutagenicity, especially the micronucleus, Salmonella, and sperm abnormality assays. In:

"Progress in genetic toxicology" vol. 2

D. Scott; B.Bridges; F.H. Sobels (Eds.)

Elsevier/North-Holland, Amsterdam (1977) 265-274

KIHLMAN B.A.

Action of chemicals on dividing cells.

Prentice-Hall Inc.

Englewood Cliffs, New Jersey 1966

KILIAN D.J.; PICCIANO D.

Cytogenetic surveillance of industrial populations.

Aus "Chemical mutagens" principles and methods for their detection.

Hollaender A. Vol. 4

Plenum Press; New York, London (1976)

KUCEROVA M.; POLIVKOVA Z.

Mutagenetic effects of different mutagens on human chromosomes in vitro as detected by conventional and "Harlequin" methods.

In: D. Scott; B.A. Bridges; F.M. Soebels (Eds.)

Progress in genetic toxicology

Elsevier/North Holland, Amsterdam 1977

LAMBERT B.; RINGBORG U.; HARPER E.; LINDBLAD A.

Sister chromatid exchanges in lymphocyte cultures of patients receiving chemotherapy for malignant disorders.

Cancer Treatm. Rep. 10 (1978) 1413-1419

MAIER P.; SCHMID W.

Ten model mutagens evaluated by the micronucleus test

Mut. Res. 40 (1976) 325-338

MOORHEAD P.S.; NOWELL P.C.; MELLMAN W.J. BATTIPS D.M.; HUNGERFORD D.A.

Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood.

Experimental Cell Research 20 (1960) 613-616

MORGAN W.F.; CROSSEN P.E.

Mitotic spindle inhibitors and sisterchromatid-exchanges in human chromosomes.

Mut. Res. 77 (1980) 283-286

MÜLLER D.; ARNI P.; FRITZ H.; LANGAUER M.; STRASSER F.

Comparative studies of 14 mutagenic or carcinogenic substances in seven mutagenicity test systems (point mutation tests, cytogenetic tests and the dominant lethal test).

Mut. Res. 53 (1978) 235

MUSILOVA J.; MICHALOVA K.; URBAN J.

Sister-chromatid exchanges and chromosomal breakage in patients treated with cytostatics.

Mut. Res. 67 (1979) 289-294

NIELSEN J.; FRIEDRICH U.; TSUBOI T.

Chromosome abnormalities in patients treated with chlorpromazine, perphenazine and lysergide.

Brit. Med. J. 3 (1969) 634-636

OBE G.; NATARAJAN A.T.

Umweltbedingte Mutationen beim Menschen

Kliniker 9 (1980) 271-289

RIEGER R.; MICHAELIS A.

Chromosomenmutationen

Fischer, Jena 1967

SCHINZEL A.; SCHMID W.

Lymphocyte chromosome studies in humans exposed to chemical mutagens.

The validity of the method in 67 patients under cytostatic therapy.

Mut. Res. 40 (1976) 139-166

SCHWARZACHER H.G.; WOLF U.

Methoden in der medizinischen Cytogenetik

Springer; Berlin, Heidelberg, New York (1970)

TATES A.D.; NATARAJAN A.T.

A correlative study on the genetic damage induced by chemical mutagens in bone marrow and spermatogonia of mice. I. CNU-Ethanol

Mut. Res. 37 (1976) 267-278

TATES A.D.; NATARAJAN A.T.; DE VOGEL N.; MEIJERS M.

A correlative study on the genetic damage induced by chemical mutagens in bone marrow and spermatogonia of mice. III. BCNU
Mut. Res. 44 (1977) 87-95

TAYLOR J.H.; HAUT W.F.; TUNG J.

Effects of Fluorodeoxyuridine on DNA replication, chromosome breakage and reunion.
Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 48 (1962) 190-198

WHORTON E.B.; BEE D.E.; KILIAN J.

Variations in the proportion of abnormal cells and required sample sizes for human cytogenetic studies.
Mut. Res. 64 (1979) 79-86

Tab. 1: Aufstellung der Patientendaten und der Chromosomenuntersuchungen

Pa- tient	Ge- schlecht	Alter zu Be- ginn der Therapie	Blutentnahme vor einem Therapieschub: v Blutentnahme nach einem Therapieschub: n keine Auswertung: * 1)											
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
B.I.E.	f	59							v*					
D.O.R.	m	49	v	v* n*						n*		v	n*	
F.U.N.	m	60						v*	n					
G.E.R.	f	55		v*	v*	v*	v*	n*						
G.L.O.	f	52	v					v*	v					
G.R.E.	m	68	v* n*		v*	v*		v*	n	v	v* n*	v*		
G.R.O.	f	46	v											
H.E.R.	f	52	v		v* n*	v	n*	v	n	v	n*		n*	
H.E.T.	f	40	v* n*											
H.I.M.	m	24		n	v	n	v* n*	v*	n*			v* n*		
H.O.L.	f	56	v*											
H.U.P.	m	63								v* n*	v* n*	v* n*		
K.I.E.	f	39			v	n	v	n	v	n	v* n*			
K.O.R.	f	39		v		v		v	n*					
K.R.A.	f	39	v						v* n*					
L.A.N.	f	60	v						v	n				
L.I.N.	m	64										v* n*	v* n*	v*
M.A.I.	f	65		n*	v* n*			v*	n*	v* n*				
M.U.E.	m	44							v*					
M.I.T.	f	59	v			v*								
P.R.P.	f	42	v		v	n	v	n	v*	v	n	v* n*		v*
P.F.I.	f	57						v*	n*					
R.E.I.	m	56						v						
S.C.I.	m	33	v*	v		n	v	v	v*		v*	v		v*
S.C.L.	f	58	v											
S.C.O.	f	43							v*					
S.C.U.	m	56												v
S.C.Z.	m	63							v*	n*	v*	n*	v*	n*
S.T.C.	m	43								v				
W.I.N.	m	49	v*		v									
Z.A.N.	m	32										v	n	

1) Vor Beginn der Auswertung wurde jedes Präparat in drei Querebenen auf die Anzahl Metaphasen untersucht. Ergaben sich weniger als drei Metaphasen pro Präparat, so wurde angenommen, daß keine 100 auswertbare Teilungsfiguren zu finden sind.

Tab. 2: Zusammenfassung der Ergebnisse einzelner Zytostasezyklen

nach einem Therapieschub mit MeCCNU bis vor dem nächsten
Therapieschub mit MeCCNU

	vor Therapie	nach 1 bis vor 3	nach 3 bis vor 5	nach 5 bis vor 7	nach 7 bis nach 12
$\frac{B}{M}$ 1)	0,036	0,108	0,172	0,269	0,510
Standard- abweichung	0,021	0,063	0,136	0,111	0,230
Mittelwerte aberranter Metaphasen in Prozent	5,00	12,28	17,93	27,27	37,96
Standard- abweichung	2,18	6,26	10,09	9,88	10,20
Mittelwerte der Meta- phasen mit Brüchen in Prozent	3,22	9,28	12,6	20,54	30,44
Standard- abweichung	1,72	6,05	8,63	7,99	8,45
Anzahl Blut- entnahmen	9	7	15	11	8

1) $\frac{B}{M}$ = Anzahl der Bruchereignisse zur Anzahl ausgewerteter Metaphasen

Mittelwerte

Tab. 3: Aufstellung der Bruchraten in Abhängigkeit von Alter und Geschlecht der Patienten

Alters- gruppen	20 bis 30 Jahre		30 bis 40 Jahre		40 bis 50 Jahre		50 bis 60 Jahre		60 bis 70 Jahre	
Geschl.	m	f	m	f	m	f	m	f	m	f
Therap.- schub	B M									
v 1				0,01	0,02	0,04 0,01	0,05	0,03 0,06 0,04		0,07
v 2			0,09	0,02						
n 2	0,09									
v 3	0,15			0,11	0,22	0,08				
n 3	0,17		0,26	0,16		0,07				
v 4			0,48	0,18 0,01		0,05		0,14		
n 4				0,18		0,14				
v 5			0,22	0,08 0,01				0,43		
n 5				0,30				0,48		
v 6						0,15	0,28			
n 6						0,40			0,15 0,31	
v 7	0,13							0,25	0,33	0,18
n 7										1,02
v 9			0,42							
v 10			0,63		0,55					
n 10			0,33							
v 11			0,39							
v 12							0,44			
n 12							0,30			

Tab. 4: Einzelergebnisse der Chromosomenanalysen

Patient	Therapie- schub vor/nach	Anzahl aus- gewerteter Metaphasen	Aberrante Metaphasen (%)	Metaphasen mit Brüchen (%)	B M	Aberrationstypen						Mitose- Indices
						G ¹	G ²	B ¹	B ²	E ¹	E ²	
D.Ö.R.	v 1	100	3	2	0,02	1	0	2	0	0	0	27
	v 10	100	47	36	0,55	15	9	32	9	7	0	6
F.U.N.	n 6	100	23	13	0,15	7	8	4	5	3	0	5
G.L.O.	v 1	100	4	3	0,03	1	0	1	2	0	0	49
	v 7	100	24	19	0,25	10	9	12	7	3	0	23
G.R.E.	n 6	100	30	25	0,31	6	6	19	12	1	0	6
	v 7	100	28	23	0,33	4	0	21	6	3	0	13
G.R.O.	v 1	100	5	3	0,04	1	0	3	1	0	0	21
H.E.R.	v 1	100	7	6	0,06	1	0	5	1	0	0	25
	v 4	100	10	9	0,14	1	0	3	1	5	0	71
	v 5	100	35	28	0,43	5	5	29	9	2	0	26
	n 5	100	45	36	0,48	10	7	34	8	3	0	5
H.I.M.	n 2	100	13	9	0,09	3	1	2	5	1	0	22
	v 3	100	20	14	0,15	7	3	9	4	0	1	11
	n 3	100	16	15	0,17	1	0	14	1	0	1	6
	v 7	100	13	11	0,13	2	1	8	3	1	0	8
K.I.E.	v 3	100	11	9	0,11	0	2	7	2	1	0	21
	n 3	100	22	11	0,16	7	6	6	4	3	0	29
	v 4	100	30	14	0,18	4	5	7	3	3	1	5
	n 4	100	18	11	0,18	6	1	4	2	4	0	22
	v 5	100	9	5	0,08	3	2	3	3	1	0	19
	n 5	100	27	22	0,30	8	1	12	4	4	0	10
K.Ö.R.	v 2	100	4	2	0,02	2	0	2	0	0	0	8
	v 4	100	2	1	0,01	1	0	1	0	0	0	12
	v 5	100	5	1	0,01	2	3	1	0	0	0	44
K.R.A.	v 1	100	3	1	0,01	2	0	1	0	0	0	7
L.A.N.	v 1	100	7	5	0,07	3	0	2	1	1	1	16
	v 7	100	33	16	0,18	5	4	9	7	1	0	18
	n 7	100	46	43	1,02	12	8	42	29	14	1	12
N.I.T.	v 1	100	9	4	0,04	3	2	3	1	0	0	16
P.R.P.	v 1	100	3	1	0,01	2	0	0	1	0	0	16
	v 3	100	8	5	0,08	1	2	1	3	2	0	32
	n 3	100	14	8	0,07	3	3	5	2	0	0	40
	v 4	100	9	4	0,05	3	3	3	0	1	0	34
	n 4	100	16	14	0,14	3	0	9	5	0	0	10
	v 6	100	10	9	0,15	3	0	5	0	5	0	8
	n 6	100	36	28	0,40	17	2	26	4	4	1	10
R.E.I.	v 6	100	31	24	0,28	13	3	14	9	2	1	10
S.C.I.	v 2	100	9	6	0,09	3	1	3	0	2	1	29
	n 3	100	29	22	0,26	9	7	14	8	2	0	34
	v 4	100	30	28	0,48	2	4	26	14	4	0	21
	v 5	100	24	18	0,22	6	3	10	4	4	0	20
	v 9	100	30	26	0,42	5	0	17	11	7	0	20
	v 11	59	23,7	18,6	0,39	3	3	6	5	6	0	25
S.C.L.	v 1	100	4	4	0,05	1	0	4	1	0	0	8
S.C.U.	v 12	100	38	30	0,44	15	4	33	3	4	0	26
	n 12	100	33	25	0,30	12	5	18	8	2	0	7
W.I.N.	v 3	100	21	20	0,22	4	1	16	4	1	0	6
Z.A.N.	v 10	100	54	40	0,63	21	8	25	18	10	0	6
	n 10	100	32	25	0,33	11	5	15	4	7	0	1
Summe						270	137	554	234	124	8	

Tab. 5: Wertepaare einzelner Patienten in aufeinanderfolgenden
Therapieschritten

1. Ergebnisse vor und nach einem Therapieschub mit MeCCNU, Fluoruracil
und Vincristin

Therapie- schub	B M	aberrante Metaphasen (%)	Metaphasen mit Brüchen (%)
v3 - n3	0,15 - 0,17	20 - 16	14 - 15
	0,11 - 0,16	11 - 22	9 - 11
	0,08 - 0,07	8 - 14	5 - 8
v5 - n5	0,08 - 0,30	9 - 27	5 - 22
v7 - n7	0,18 - 1,02	33 - 46	16 - 43
$\bar{X}$	0,12 - 0,34	16,2 - 25	9,8 - 19,8

2. Ergebnisse vor und nach einem Therapieschub mit Fluoruracil
und Vincristin

Therapie- schub	B M	aberrante Metaphasen (%)	Metaphasen mit Brüchen (%)
v4 - n4	0,18 - 0,18	30 - 18	14 - 11
	0,05 - 0,14	9 - 16	4 - 14
v6 - n6	0,15 - 0,40	10 - 36	9 - 28
$\bar{X}$	0,13 - 0,33	5,4 - 23,3	9,0 - 17,6
v10 - n10	0,63 - 0,33	54 - 32	40 - 25
v12 - n12	0,44 - 0,30	38 - 33	30 - 25
$\bar{X}$	0,29 - 0,27	28,2 - 27	19,4 - 20,6

3. Ergebnisse vor und nach einer Therapiepause

Therapie- schub	B M	aberrante Metaphasen (%)	Metaphasen mit Brüchen (%)
n2 - v3	0,09 - 0,15	13 - 20	9 - 14
n3 - v4	0,26 - 0,48	29 - 30	22 - 28
	0,16 - 0,18	22 - 30	11 - 14
	0,07 - 0,05	14 - 19	8 - 4
n4 - v5	0,18 - 0,08	18 - 9	11 - 5
n6 - v7	0,31 - 0,33	30 - 28	25 - 23
$\bar{X}$	0,18 - 0,21	21,0 - 22,6	14,3 - 14,6

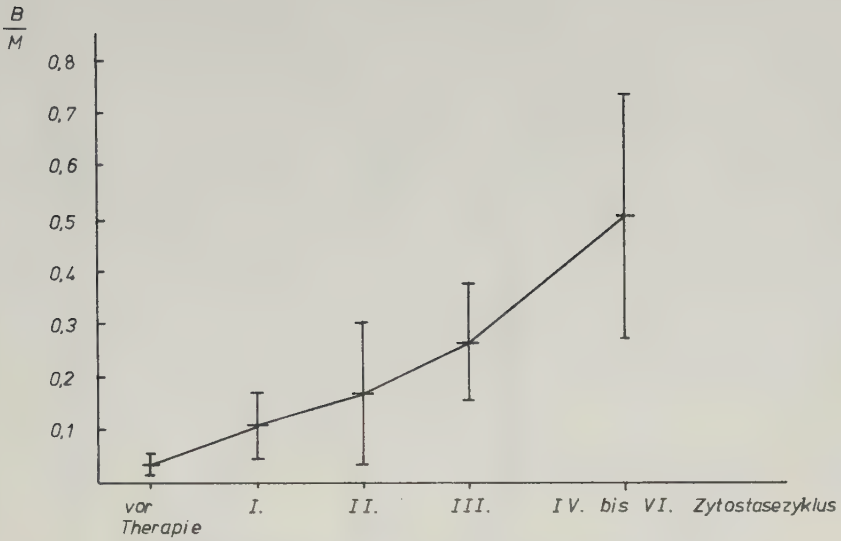


Abb. 1 Mittelwerte und Standardabweichungen der Bruchraten von Zytostasezyklen

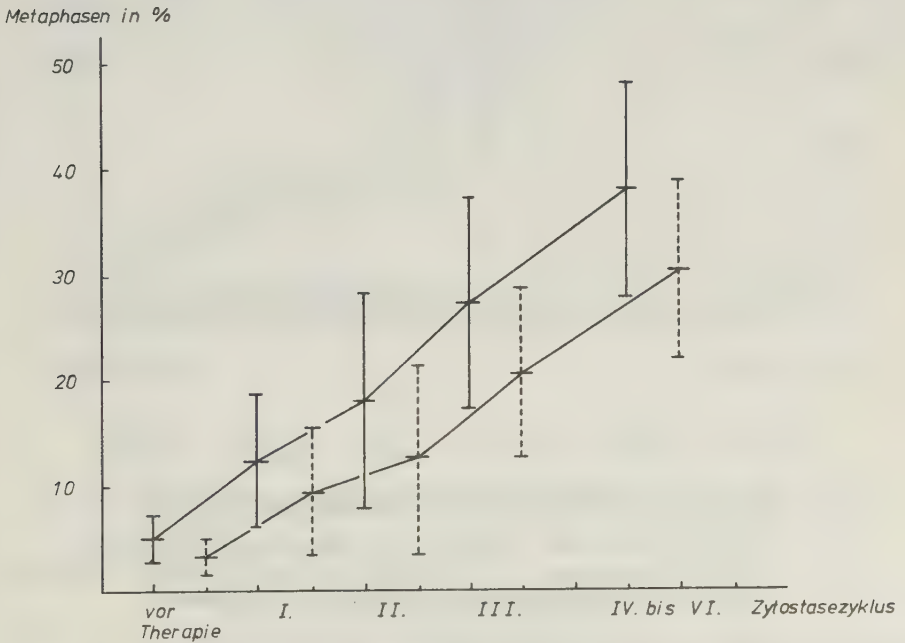


Abb. 2 Auf Zytostasezyklen bezogene Mittelwerte und Standardabweichungen der aberranten Metaphasen in % und der Metaphasen mit Brüchen in %

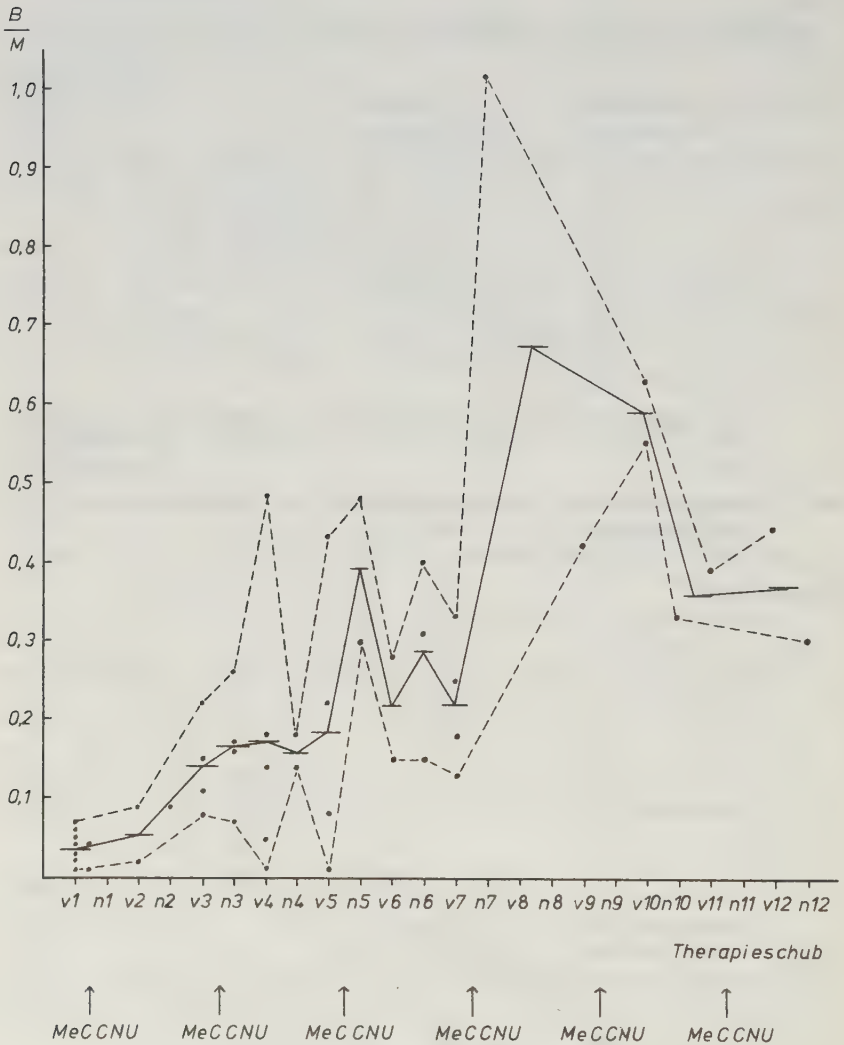


Abb. 3 Bruchraten und ihre Streuung im Verlauf der Therapie

Die Mittelwerte der Bruchraten —, die niedrigsten und die höchsten Bruchraten ----- eines oder zweier aufeinanderfolgender Blutentnahmezeitpunkte sind untereinander verbunden.

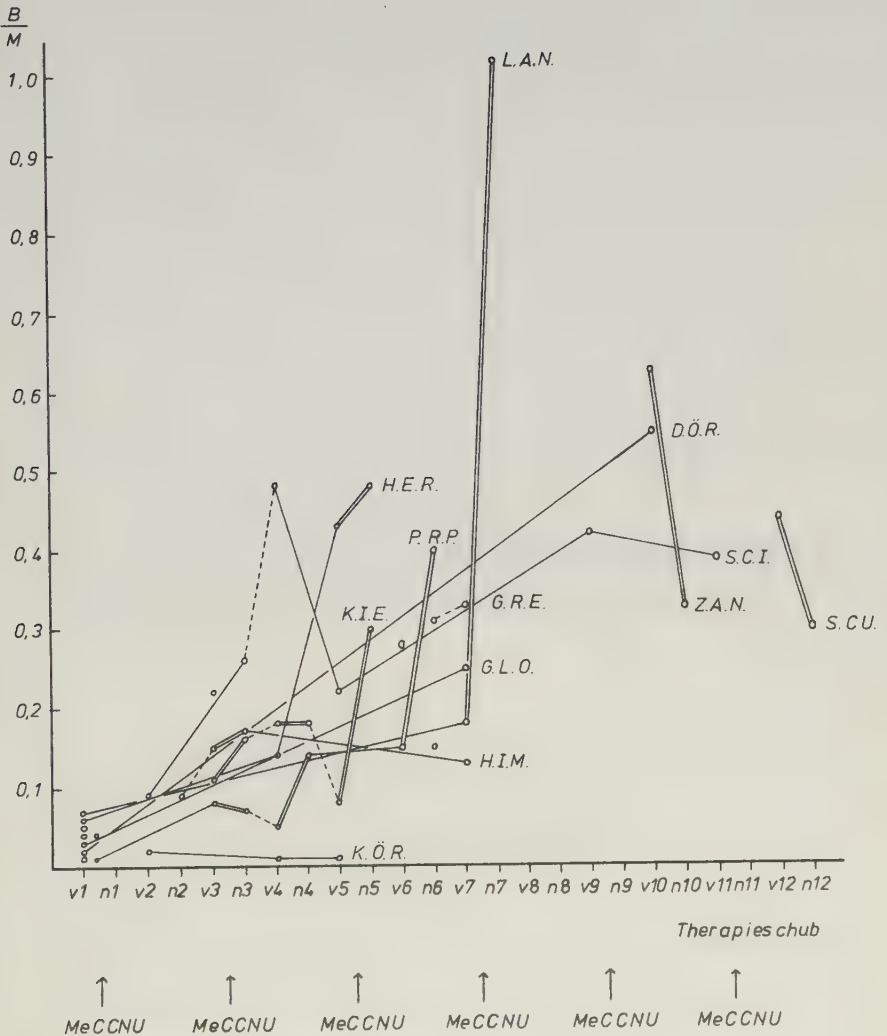


Abb. 4 Bruchraten einzelner Patienten im Verlauf der Therapie

$\frac{B}{M}$ Wertepaare eines Patienten:

- vor und nach einem Therapieschub
- - - vor und nach einer Therapiepause
- zwischen denen mehrere Therapieschritte liegen

Für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes und die gute Betreuung möchte ich Herrn Professor Dr. E. Gebhart danken.

Lebenslauf

Am 23.11.1950 wurde ich als drittes Kind des Kaufmanns Alex Lösing und seiner Ehefrau Anna, geb. Dües, in Vreden, Westfalen geboren.

Von 1957 bis 1961 besuchte ich die dortige Volksschule, bis 1965 das neusprachliche Gymnasium St. Canisius in Ahaus, Westfalen und im Anschluß daran bis 1969 den neusprachlichen Zweig des Georgianums in Vreden.

Vom Oktober 1969 bis zum Wintersemester 1973/74 studierte ich an den Universitäten Hamburg und Münster die Fächer Biologie und Pädagogik. Im Sommersemester 1974 begann ich an der Universität Erlangen das Medizinstudium und bestand hier am 27.8.1976 die ärztliche Vorprüfung, im August 1977 den ersten Abschnitt und am 21.8.1979 den zweiten Abschnitt der ärztlichen Prüfung. Am 30.10.1980 legte ich die ärztliche Prüfung in Erlangen ab.

Copy-Center 2000

852 ERLANGEN · Obere Karlstr. 30
Tel. 09131-26197